

CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS BRUTOS DA ANADENANTHERA COLUBRINA (VELL.) BRENAN

Elys Karine Carvalho da Silva (1); Rayza Helen Graciano dos Santos (2); Maíra Honorato de Moura Silva (3); Márcia Vanusa da Silva (4)

- (1) Universidade Federal de Pernambuco, departamento de bioquímica, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, elyskarinec@gmail.com;
(2) Universidade Federal de Pernambuco, departamento de ciências biológicas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, rayzahelen@hotmail.com;
(3) Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Botânica, Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal, Laboratório de Ecologia Aplicada e Fitoquímica, mairamhms@hotmail.com;
(4) Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de bioquímica, marciavanusa@yahoo.com.br

Resumo: A Caatinga apresenta riqueza em plantas que, como estratégia de sobrevivência, produzem um número maior de metabólitos secundários. Estes são de grande importância, uma vez que possuem efeitos biológicos sobre várias patologias. As plantas do gênero *Anadenanthera* são usadas na medicina popular como antidiarreico e no tratamento das infecções pulmonares. O presente trabalho teve como objetivo determinar a caracterização fitoquímica de extratos brutos de ramos da *Anadenanthera colubrina* e o seu potencial antioxidante. As plantas foram coletadas em Buíque, Pernambuco. Os extratos foram caracterizados pelo método de Cromatografia em Camada Delgada (CCD). Foram realizados cinco testes para avaliar a atividade antioxidante dos extratos: dosagem de fenóis e flavonoides, método do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), método de 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS) e método de fosfomolibdênio. O CCD mostrou que o extrato aquoso apresenta maior presença de metabólitos testados. A média do teor de compostos fenólicos do extrato aquoso (218,22 mg EAG/g¹) foi maior do que a do extrato metanólico (104,06 mg EAG/g¹). A concentração de flavonoides dos extratos não foi significativa. O extrato aquoso (290,46 µg/mL) apresentou melhor IC₅₀ em comparação com o extrato metanólico (391,19 µg/mL) e 82,99% de inibição do radical ABTS. No teste de fosfomolibdênio, o extrato aquoso (137,65%) apresentou maior atividade em relação ao extrato metanólico (34,35%) e ao ácido ascórbico (100%). Com base nos resultados obtidos, esta espécie pode ser considerada uma boa fonte de antioxidantes. Porém, o extrato aquoso apresentou melhores resultados nos testes, por isso, pode ser considerado um melhor líquido extrator.

Palavras-chave: Antioxidantes, *Anadenanthera colubrina*, Caatinga, Metabólitos secundários.

Introdução

O gênero *Anadenanthera* é composto por duas espécies, *Anadenanthera peregrina* e *Anadenanthera colubrina* (Torres e Repke, 2006). Conhecida popularmente como angico, a *Anadenanthera colubrina*, pertence à subfamília *Mimosoideae*, presente na família *Fabaceae*, indicada como uma das maiores famílias de angiospermas (Alves et al., 2014).

A. colubrina é utilizada como opção para tratamentos de saúde na medicina popular brasileira. As comunidades usam partes da planta como a casca no tratamento de infecções pulmonares e das vias respiratórias, geralmente usam-se macerados da droga vegetal em soluções hidroalcoólicas, administradas aleatoriamente até a ausência dos sintomas característicos dessas doenças, como tosse ou diarreia (Agra et al., 2007).

(83) 3322.3222

contato@conadis.com.br

www.conadis.com.br

Araújo et al. (2014) observou a presença dos metabólitos secundários: taninos, flavonoides, proantocianidinas, triterpenos e açúcares no extrato hidroalcoólico nas folhas desta espécie. Estudos adicionais também indicam que não há diferença significativa entre a quantidade de taninos, compostos responsáveis pela adstringência, ação anti-inflamatória e antimicrobiana de muitos produtos vegetais, presentes na casca do caule e das folhas da *A. colubrina*. Fato que motiva a realização de pesquisas em outras partes da planta (Monteiro, 2006).

As defesas antioxidantes endógenas, incluindo enzimas e compostos não enzimáticos, tentam combater o estresse oxidativo que acontece por causa do desequilíbrio entre a produção de substratos oxidáveis e o sistema de defesa antioxidante. Algumas espécies de plantas, chamadas antioxidantes biológicos, podem ajudar o sistema antioxidante exógeno neste processo (Barros et al., 2016). Suas funções são, por exemplo, diminuir o estresse oxidativo, lesões no DNA, mutações malignas e outros danos celulares (Godic et al., 2014). Algumas espécies da família *Fabaceae* como *Genista tinctoria* e *Genistella sagittalis* demonstraram forte ação contra espécies reativas e um percentual elevado de compostos fenólicos (Hanganu et al., 2016).

O objetivo deste estudo foi determinar a caracterização fitoquímica e analisar a presença do potencial antioxidante em extratos aquoso e metanólico de galhos da planta *A. colubrina*, coletadas em uma área da Caatinga brasileira, um domínio fitogeográfico exclusivamente brasileiro, que apresenta condições de solo e temperatura singulares, além de diversas outras espécies de plantas ricas em compostos bioativos que demonstram elevado potencial biotecnológico e econômico para as populações locais.

Metodologia

Coleta da amostra

Os galhos da *Anadenanthera colubrina* foram coletados no Parque Nacional do Catimbau (PARNA do Catimbau), Pernambuco, Brasil, em Julho de 2016. A sua identificação botânica foi realizada no Herbário do Instituto de Pesquisa Agrônômica de Pernambuco (IPA-PE), onde o seu voucher (IPA 84.039) está depositado.

Preparação dos extratos

Para o preparo dos extratos metanólico e aquoso da *A. colubrina*, os galhos coletados ficaram por um período de sete dias secando a temperatura ambiente e em seguida, foram moídos.

O processo de extração foi realizado misturando-se 10 g dos galhos moídos com 100 mL de metanol e água, posteriormente submetidos à agitação por uma hora em um shaker. Após agitação, o sobrenadante formado foi filtrado, sendo este processo repetido por três vezes.

O extrato metanólico adquirido foi submetido à rotaevaporação sob pressão reduzida a uma temperatura média de 45°C com a finalidade de concentrar este extrato, obtendo rendimento de 29,5%. E o extrato aquoso, submetido à liofilização também para concentra-lo e seu rendimento foi de 37,6%.

O rendimento foi calculado de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{Rendimento} = \frac{\text{Peso da amostra} - \text{Peso do tubo} \times 100}{10}$$

Análise fitoquímica

Os testes fitoquímicos para detectar a presença compostos biológicos nos extratos foram realizados por cromatografia em camada delgada (CCD) usando sistemas de desenvolvimento adequados e reveladores, como mostrado na tabela 1.

Tabela 1: Sistemas e reveladores utilizados na análise fitoquímica

Classe de metabólitos secundários	Padrões	Sistema de eluição	Revelador	Referências
Flavonoides e fenilpropanoglicosídeos	Quercetina, rutina e ác. clorogênico	AcOEt - HCOOH - AcOH - H₂O (100: 11: 11: 27 v/v)	NEU	Wagner & Blatt, 1996; Brasseur & Angenot, 1986
Triterpenos e esteróides	β-sitosterol	Tolueno: AcOEt (90: 10 v/v)	Lieberman & Burchard	Harborne, 1998
Saponinas	-	AcOEt - HCOOH - AcOH - H₂O (100: 11: 11: 27 v/v)	Lieberman & Burchard	Harborne, 1998
Mono e sesquiterpenos	Timol	Tolueno: AcOEt (97: 3 v/v)	Anisaldeído sulfúrico	Harborne, 1998
Cumarinas e Quinonas	Cumarina e lapachol	CHCl₃ - MeOH (98: 2 v/v)	KOH	Wagner & Blatt, 1996
Alcaloides	Pilocarpina	AcOEt - HCOOH - AcOH - H₂O (100: 11: 11: 27 v/v)	Dragendorff	Wagner & Blatt, 1996
Proantocianidinas condensadas	Catequina	AcOEt - HCOOH - AcOH - H₂O (100: 11: 11: 27 v/v)	Vanilina clorídrica	Roberts et al. 1957

Taninos hidrolisáveis	Ácido gálico	n - BuOH - H₂O - AcOH (40: 50: 10 v/v)	Alúmen de ferro 1%
Açúcares redutores	Glicose	n - BuOH - Me₂CO - TF (pH = 5,0) (40:50:10 v/v)	Trifeniltetrazólio 4% Metz, 1961

Ensaio antioxidante

Dosagem de compostos fenólicos

O método de dosagem dos compostos fenólicos foi realizado de acordo com a metodologia previamente descrita por Hua-Bin (2007) com algumas modificações.

Foram adicionados 20 µL da solução dos extratos (1 mg/mL), do ácido gálico (1 mg/mL), utilizado como padrão, e 100 µL do reagente de Folin em ambiente escuro em uma placa de 96 poços. Após 3 min, adicionou-se 80 µL do Na₂CO₃. O metanol e água foram usados como controle negativo da reação em substituição aos extratos. Após 30 min de incubação no escuro e à temperatura ambiente, as absorbâncias foram lidas no comprimento de onda de 765 nm.

Os fenóis totais contidos nas amostras foram calculados usando o ácido gálico como referência e os resultados foram expressos em miligrama Equivalente de Ácido Gálico (EAG) por grama do extrato (mg EAG/g¹ extrato).

Dosagem de flavonóides

Os flavonóides contidos nos extratos foram mensurados através da metodologia descrita por Woisky e Salatino (1998).

Foram adicionados 100 µL dos extratos (1 mg/mL), da curva padrão da quercetina (10 a 100 µg/mL), utilizada como padrão, e dos controles negativos junto com 100 µL do reagente. Após uma hora de incubação no escuro, as absorbâncias foram lidas em um comprimento de onda de 420 nm.

Os flavonóides contidos foram estimados usando a curva padrão da quercetina e os resultados foram expressos em miligrama Equivalente da Quercetina por grama do extrato (mg EQ/g¹ extrato).

Método de DPPH (Radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil)

O método utilizado foi baseado na metodologia de Blois (1958), utilizando o radical estável DPPH.

Foi realizada uma diluição seriada dos extratos e do ácido gálico, utilizado como padrão, nas concentrações de 500 µg/mL; 250 µg/mL; 125 µg/mL; 62,5 µg/mL; 31,25 µg/mL e 15,625

$\mu\text{g/mL}$. 40 μL destas diversas concentrações foram adicionadas a 250 μL do reagente DPPH em uma placa de 96 poços e após 30 min de incubação no escuro à temperatura ambiente, as absorvâncias foram lidas no comprimento de onda de 517 nm. O controle negativo utilizado corresponde à solução de DPPH sem a amostra. Os experimentos foram feitos em triplicata.

Calculou-se a porcentagem de atividade de eliminação de radical DPPH pela seguinte fórmula:

$$\% \text{ da atividade de eliminação do DPPH: } \frac{\text{Absorbância do controle} - \text{Absorbância da amostra}}{\text{Absorbância do controle}} \times 100$$

Com os resultados da aplicação da fórmula, foi traçado um gráfico da atividade de eliminação do DPPH contra as diferentes concentrações dos dois extratos e obteve-se a IC_{50} , que denota a concentração da amostra necessária para diminuir a concentração inicial de radicais DPPH em 50%.

Método de ABTS (2,2'- azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico))

O ensaio de eliminação de radicais ABTS foi realizado de acordo com Re et al. (1999) com pequenas modificações.

Foram misturados 20 μL dos extratos vegetais (1 mg/mL) com a solução de ABTS e deixados em repouso durante 6 min antes de se medir a absorvância a 734 nm contra uma solução controle (solução de trabalho adicionada a metanol e água) e o trolox foi aplicado como padrão.

A eliminação dos radicais ABTS foi estimada em porcentagem após o cálculo da inibição dos radicais, calculada pela seguinte fórmula:

$$I (\%): \frac{\text{Absorbância do controle} - \text{absorbância da amostra}}{\text{Absorbância do controle}} \times 100$$

Método de fosfomolibdênio ou atividade antioxidante total

O método de fosfomolibdênio foi realizado seguindo a metodologia de Prieto et al. (1999) com pequenas modificações.

A solução dos extratos testados e a solução do ácido ascórbico ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$), considerada como padrão para o teste, foram utilizadas na concentração de 1 mg/mL.

Após o preparo das soluções e do reagente, adicionou-se 1 mL da solução de fosfomolibdênio em 100 μL dos extratos, repetindo-se essa ação com o controle (solução de

trabalho adicionada a metanol e água) e o ácido ascórbico, em triplicata. Foi necessário incubá-los por 90 min a 95°C no banho seco.

Para a determinação das absorvâncias, 200 µL de cada mistura previamente incubada foram colocadas em uma placa de 96 poços e a leitura foi feita no comprimento de onda de 695nm.

A atividade antioxidante total (AAT) foi expressa em relação ao ácido ascórbico e calculada pela seguinte fórmula:

$$\text{AAT (\%)} = \frac{\text{Absorvância da amostra} - \text{Absorvância do controle}}{\text{Absorvância do ác. ascórbico} - \text{Absorvância do controle}} \times 100$$

Resultados e discussão

Análise fitoquímica

A análise fitoquímica dos extratos mostrou que o aquoso apresentou maior presença de compostos quando comparado ao metanólico, como mostra a tabela 2.

Tabela 2: Análise fitoquímica (CCD)

METABÓLITOS	Ext. Aquoso	Ext. Metanólico
Alcaloides gerais	-	-
Proantocianinas	-	-
Compostos Fenólicos	+	-
Cumarinas	-	-
Derivados Antracênicos	+	+
Lignanas	++	++
Mono, sesqui e diterpenos	++	-
Naftoquinonas	+	-
Saponinas	+	-
Taninos Condensados	+	-
Taninos Hidrolisáveis	+	-
Triterpenos e Esteroides	+	-
Xantinas	-	-

Compostos fenólicos e flavonoides totais

A média do teor de compostos fenólicos do extrato aquoso (218,22 mg EAG/g¹) foi maior do que a média obtida com os testes do extrato metanólico (104,06 mg EAG/g¹) (Tabela 3), isto acontece, pois o líquido extrator exerce importante influência sob a extração destes compostos.

Dentro os compostos fenólicos, a subclasse mais estudada é a dos flavonoides que, nas plantas, são responsáveis pela pigmentação e pode estar relacionada com funções de defesa.

A concentração de flavonoides nos valores de 1,31 mg EQ/g¹ para o extrato metanólico e 2,88 mg EQ/g¹ (Tabela 3) para o extrato aquoso não foi significativa em comparação com os valores da quercetina (99,18 mgEQ/g¹), utilizada como padrão pois possui requisitos estruturais necessários para uma potente atividade antioxidante.

Tabela 3: Conteúdo de fenóis totais e flavonóides totais em mg EQ/g¹

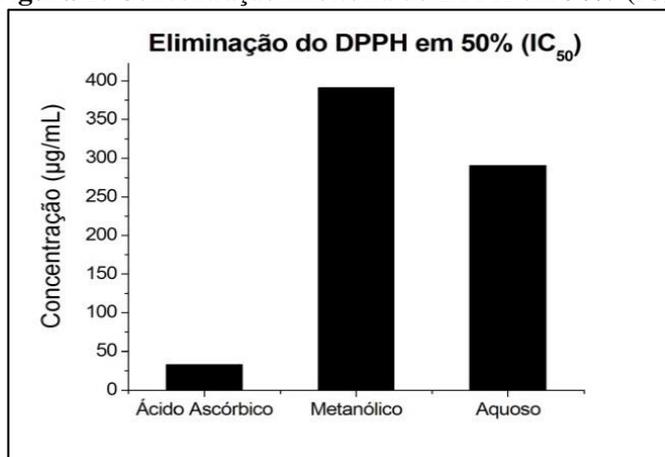
Amostras	Teor de fenóis totais (mg EQ/g ¹)	Teor de flavonoides totais (mg EQ/g ¹)
Metanólico	104,06	1,31
Aquoso	218,22	2,88

Com os resultados observados, é possível afirmar que a significativa concentração de compostos fenólicos totais encontrados, em contrapartida com a baixa concentração de flavonóides totais nas amostras indica que outras substâncias fenólicas, que não os flavonóides, são os compostos bioativos presentes na *A. colubrina*.

Método de DPPH

O extrato aquoso (290,46 µg/mL) apresentou melhor IC₅₀ em comparação com o extrato metanólico (391,19 µg/mL). Os dois extratos apresentaram concentração de inibição em 50% dos radicais DPPH muito superior ao ácido ascórbico (32,97 µg/mL), que é uma substância referência utilizada nas análises de atividade antioxidante pela sua capacidade de reduzir rapidamente o DPPH (Figura 1).

Figura 1: Concentração inibitória do DPPH em 50% (IC₅₀)

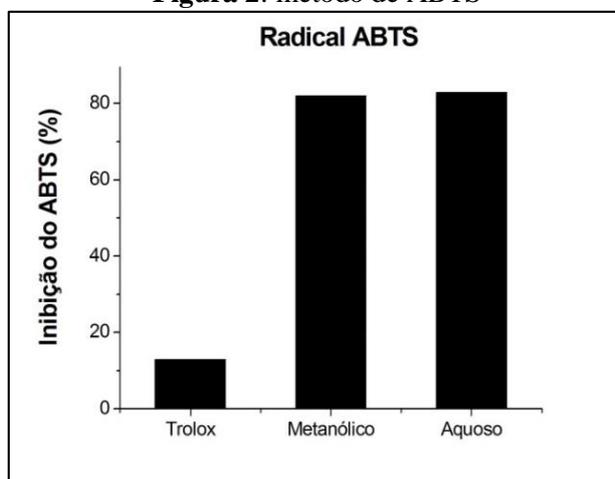


Método de ABTS

Os resultados desse método foram obtidos de acordo com a porcentagem de atividade de inibição do radical ABTS. Os experimentos mostraram que o extrato aquoso apresentou 82,99% de inibição do radical ABTS, enquanto o extrato metanólico apresentou 82,2%, valores que quando comparados ao Trolox, utilizado como padrão, que apresentou 12,91% de inibição, mostram que a *A. colubrina* tem um grande potencial inibitório do radical (Figura 2).

Dzoyem et al. (2014) fizeram um estudo com plantas da família Fabaceae onde se obtiveram resultados que mostram uma significativa capacidade de inibição do radical ABTS nas 9 espécies estudadas. Além disso, os índices de atividade antioxidante foram relacionados com o alto conteúdo de compostos fenólicos presentes nos extratos, corroborando com o que foi apresentado no presente estudo.

Figura 2: método de ABTS

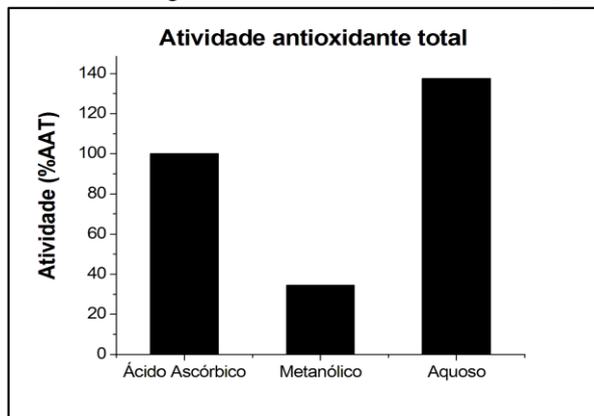


Método de fosfomolibdênio ou atividade antioxidante total

Como mostra a figura 3, o extrato aquoso (137,65 %) apresentou maior atividade antioxidante total em relação ao extrato metanólico (34,35%) e ao ácido ascórbico (100%).

Além disso, o extrato aquoso foi o que apresentou maior conteúdo fenólico total entre os extratos testados, isto corrobora com estudos que sugerem a existência de uma correlação positiva entre o conteúdo fenólico e a atividade antioxidante das plantas.

Figura 3: Porcentagem de atividade antioxidante total (%AAT)



Conclusão

Com base nos resultados obtidos no presente estudo, conclui-se que os extratos metanólico e aquoso dos galhos da *A. colubrina* apresentam uma considerável atividade antioxidante em todos os ensaios testados e possuem quantidades substanciais de compostos fenólicos. Assim, esta espécie pode ser considerada uma boa fonte de antioxidantes.

Apesar dos dois solventes serem capazes de extrair compostos biológicos, o extrato aquoso apresentou melhores resultados nos testes da atividade antioxidante, possivelmente porque também obteve maior quantidade de compostos fenólicos que são considerados fundamentais para esta função, por isso, pode ser considerado um melhor líquido extrator.

São necessários mais estudos para isolar os compostos bioativos responsáveis pelos resultados positivos obtidos e para avaliar a atividade antioxidante *in vivo*.

Referências

AGRA, M. F.; BARACHO, G. S.; NURIT, K.; BASÍLIO, I. J. L. D.; COELHO, V. P. M. Medicinal and poisonous diversity of the flora of “Cariri Paraibano”, Brazil. *J Ethnopharmacol*, 111 (2): 383–395, 2007.

ALVES, H. M. A diversidade química das plantas como fonte de fitofármacos. *Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola*, 3: 10-15, 2001.

BLOIS, M. S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, 181: 1199–1200, 1958.

GODIC, A.; POLJSK, B.; ADAMIC, M.; DAHMANE, R. The role of antioxidants in skin cancer prevention and treatment. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 6, 2014.

HUA-BIN, L.; WING, C. K.; CHI-CHUN, W.; KING-WAI, F.; FENG, C.; YUE, J. Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions of selected microalgae. *Food Chemistry*. Barking, 102: 771–776, 2007.

MONTEIRO, J. M.; ALBUQUERQUE, U. P.; LINS NETO, E. M. F.; ARAÚJO, E. L.; AMORIM, E. L. C. Use patterns and knowledge of medicinal species among two rural communities in Brazil's semi-arid northeastern region. *J Ethnopharmacol*: Lausanne, 105: 1-2, 173-186, 2006.

PIETRO, P.; M. PINEDA.; M, AGUILAR. Spectrophotometric quantification of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. *Anal. Biochem*, 269: 337–341, 1999.

RE, R.; PELEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization. *Free Radical & Medicine*, 6, 9/10: 1231-1237, 1999.

TORRES, C. M.; REPKE, D. *Anadenanthera*: visionary plant of ancient South America. ed.1 Binghamton: The Haworth Herbal Press. p. 206, 2006.

WOISKY, R. G.; SALATINO, A. Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. *Journal of Apicultural Research*, 37, 2, 99-105, 1998.